

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-112755

(43)Date of publication of application : 25.04.1990

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

(21)Application number : 63-265057

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 20.10.1988

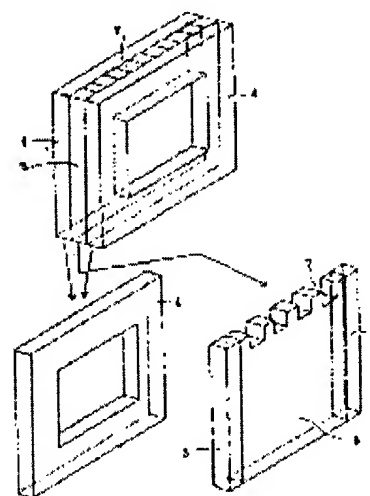
(72)Inventor : OGAWA MASASHI
MAKINO YOSHIHIKO

(54) ELECTROPHORESIS METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the method useful for the electrophoresis sepn. by pulse electric fields of macro-DNA molecules by providing 1st electrode materials which impress the electric field to a gel film in parallel with the surface thereof and 2nd electrodes which impress the electric field to the gel film in the thickness direction thereof and impressing the one electric field between the 1st electrode materials and the electric field in the reverse direction alternately between the 2nd electrode materials, respectively.

CONSTITUTION: Spacers are crimped to both ends of two sheets of square glass plates each having an aperture in the central part and after the apertures are sealed by a flat glass to be fitted therein, a comb is mounted to the upper part to form the agarose gel film. Namely, the gel film is constituted of the glass plates 4, the spacers 5 and the gel film 6. The agarose is dissolved by using a TBE buffer and is rested at ordinary temp. to cure. The gel film is constituted in such a manner and after +2V DC is impressed for 15 seconds in the direction perpendicular to the surface, 300V DC voltage is impressed for 2 minutes in the surface direction, then the voltage in the thickness direction is set at -2V and this operation is iterated.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平2-112755

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)4月25日

G 01 N 27/447

8506-2G

G 01 N 27/28

3 1 5 A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 電気泳動方法

⑯ 特 願 昭63-265057

⑰ 出 願 昭63(1988)10月20日

⑱ 発 明 者 小 川 雅 司 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内

⑲ 発 明 者 牧 野 快 彦 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内

⑳ 出 願 人 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地

明 細 書

1. 発明の名称

電気泳動方法

2. 特許請求の範囲

(1) 電気泳動媒体であるゲル膜の面に平行に電界を印加できる第1の電極対と、ゲル膜の厚み方向に電界を印加できる第2の電極対を設け、第1の電極対の間には一方向に持続する電界を、第2の電極対の間には交互に逆方向の電界を印加することを特徴とする電気泳動方法。

(2) 前記第1の電極対に印加される電界は実質的に同じ強さで1秒以上持続する電界であり、前記第2の電極対に印加される電界は交互に逆方向に印加され同じ方向に持続する時間は60秒を越えない電界である特許請求の範囲(1)の電気泳動方法。

(3) 前記第1の電極対に印加される電界の持続時間の、前記第2の電極対に印加される交番電界の一方向の持続時間に対する比が3以上である特許請求の範囲(2)の電気泳動方法。

発明の詳細な説明

3. 詳細な説明

〔発明の分野〕

本発明は、電気泳動の分野に関する。本発明は、巨大DNA分子のパルス電界による電気泳動分離に有用な電気泳動媒体に関する。

〔発明の背景〕

ゲル電気泳動は、遺伝子工学の分野において蛋白質や核酸のような高分子物質を分離する手段として極めて重要である。従来の連続電気泳動では十数KbpのDNAまで分離可能であったが、これ以上のDNAを分離することができなかつた。1982年 Cantor らは特表昭59-502037に開示している puls gradient electrophoresis (交差する電界を交互に印加する方法)を見いだした。現在までに考案された方法として Olson らは Nucleic acids research, 12, 5647 (1984)に開示している OFAGE (orthogonal field alternation gel electrophoresis)、F IGE (field inversion gel electrophoresis)、Gardiner らの V-PFG (Somatic cell. Mol.

Genet., 12, 185(1986))、Davis らによる C H E F (Science, 234, 1582(1986))が知られている。これらは、いずれも電界方向を変化させることにより DNA の形状を変化させて塩基数の異なる DNA を相互に分離する方法であり、電界が DNA の形状を変化させる作用と、泳動させる作用の二つを兼ねている。例えば、O F A G E 法においては電極を 45 度の角度で設置し、あいだの空間にアガロースの 1% ゲルを置き、電界の強度を 10 V/cm にし、数十秒の間隔で交互に電界を印加し、約 15 時間電気泳動することにより約 400 Kbp の DNA まで分離することができる。DNA の形状を変化させながら分離させるこの方法の問題点は、電界の方向に角度がついていることに起因して、泳動像が重むるので DNA の分子量を決定する際に誤差が大きくなることである。

また F I G E においては電界の方向を 180 度で反転させる。この方法では、電界が正確に一定方向であるため分離像の歪みの問題はない。しかし、分離する DNA の大きさによりパルスの条件

の厚み方向に印加できる第 2 の電極対を個別に設け、第 1 の電極対の間に DNA 分子を移動させるための電界を、第 2 の電極対の間に DNA 分子を変形するための分離用電界を印加する電気泳動方法によって解決された。

[発明の構成の詳細]

本発明は巨大 DNA 分子を泳動させるための電界と、巨大 DNA 分子を変形させるための電界とをそれぞれ単独にコントロールすることにより、従来の方法では不可能または不充分であった分離分析を可能とする電気泳動方法である。

本発明の電気泳動方法の特徴をなす電界の印加方法について説明する。

DNA 分子を泳動させる力を与える電界 (VE と略す) は、分離媒体であるゲル膜面に実質的に平行に印加する。DNA 分子を泳動させるためにゲル膜面に平行に印加される電界 (VE) は、ゲル膜面 1 cm あたり 5 ないし 100 V が適当である。電界の持続時間は 0.1 秒ないし 1000 秒が適当である。1 秒ないし 600 秒が好ましい。

を選択しても、ゲル膜全体にわたって順方向と逆方向に一定の電界しか与えられず、このため目的の分子量領域の DNA 分子を変形させることが十分にできず、分離可能な DNA の分子量範囲が狭いという問題点がある。また電界を逆転させるために、見掛け上の泳動速度がおそい。このような問題点を解決することは、遺伝子解析のスピードを上げるために重要である。

[解決すべき技術的課題]

本発明の技術的課題は、電気泳動法を利用して巨大 DNA 分子を分離する際に

- 1) 分離可能な DNA の分子量範囲を広げること、
- 2) 巨大 DNA の分子量に適した電気泳動条件の設定を容易にすること、
- 3) 泳動時間を短くし、実験効率を高めること
- 4) 泳動像の歪みを防ぐこと

である。

[技術的課題の解決手段]

本発明において上記課題は、電界をゲル膜面に平行に印加できる第 1 の電極対と、電界をゲル膜

DNA の分子形状を変化させる力を与える電界 (VS と略す) は分離媒体であるゲル膜の面に対してほぼ垂直の方向に印加する。印加領域はゲル全面に印加しても良いし、一部に印加しても良い。VS はパルス状に印加する。+100 V から -100 V の範囲の電圧を用い、1 ミリ秒から約 1000 秒の範囲から選択される任意の時間単位で、電圧を間欠的に変化させる。電圧の変化させ方に特に制限はなく、例えば電圧印加の間での電圧をゼロにしてもよいし、交互に印加される電圧の絶対値は等しくなくてもよい。パルスの印加時間は、分離する分子量の大きさにより選択される。印加時間は 0.01 秒から 1000 秒が適当で、好ましくは 0.1 秒から 60 秒の範囲である。パルス間隔は 0.01 秒から 10 秒程度が適当である。好ましくは 0.1 秒から 10 秒の範囲である。

電気泳動方法としては垂直式電気泳動法、水平式電気泳動法、ディスク式電気泳動法、無担体電気泳動法等いずれを用いてもよい。

電気泳動媒体には特に制限はないが、通常用い

られるのはアガロースである。ゲルの濃度として0.4-4%の範囲が用いられる。アガロースとしては任意のものを選ぶことができ、低電気浸透性、中電気浸透性、高電気浸透性アガロースのいずれをも用いることができる。用いることのできるアガロースの例として、特開昭55-5730号、特開昭55-110946号、特表昭57-502098号等に開示されたアガロース等がある。

ゲル膜の厚さは特に制限はないが、0.1mm-1.0mmであり、実用的に好ましい範囲としては約0.2-5mmである。

電気泳動媒体を支える支持体として通常用いられるものは、ガラス板、セラミックス、プラスチック材料例えばアクリル樹脂、ポリ塩化ビニール、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレンテレフタレート等がある。支持体は片側のみでもよく、また両側からゲルを支持してもよい。ゲル膜の作成方法としては2枚のガラス板を用いて空間を作成するモールド法を用いることができる。

TBEバッファ(1ℓ当たり10.3gのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、5.5gのホウ酸、0.93gのEDTAジナトリウム塩を含む)を用いてアガロースを溶解した。室温に放置してゲル化させた。

作製したゲル膜を第2図に示す泳動装置に装着した。第2図は泳動装置の断面図で、1は泳動槽、2は上部緩衝液槽、3は支持枠、4は支持板、6はゲル膜、7は試料注入用ウェル、8は上部電極、9は下部電極、10と11は水平方向電界を与えるための電極、12は液排出口、13は液入り口を示す。上部緩衝液槽と泳動槽にそれぞれ上記TBEバッファを入れた。DNA試料はT、d C DNA(166Kb)、λ DNA(48Kb)、λ DNA Hind III分解物(23.13Kb、9.42Kb、6.56Kb、4.36Kb、2.32Kb、2.02Kb、0.56Kb、0.13Kb)を用いた。各DNAの試料0.02μgを10%グリセリンとTBEバッファと0.0015%ブROMOフェノールブルーとからなる液5μℓにとか

二重鎖DNAの検出には、電気泳動後、通常のようにエチジウムブロミドのような蛍光剤を用いて発色させて可視化させた後、写真を撮り分離状況を解析する。

本発明は、パルス電場による巨大DNAの分離技術を利用して、従来公知の技術では分離不可能であるか又は充分分離できなかった電気泳動分析を可能とする。

可能な用途としては、染色体DNAの分離、染色体マッピング、適当な遺伝子ライブラリの作成などがある。

次に本発明の実施例を示す。

[実施例1]

15cm×12cmの開口部を有する20cm角のガラス板2枚の両端部に厚さ2mmのスペーサーをはさみ、開口部をそれにちょうどはまり込むガラス平板で封じた後、コーンを上部に装着して第1図に示すようなアガロースゲル膜を作成した。第1図で、4はガラス板、5はスペーサー、6はゲル膜を示す。アガロースゲル濃度は1%とし、

して使用した。試料は、先端をカットしたピペット(Gilson Pipetman)を用いてウェルに充填した。電気泳動は温度を14℃にし、泳動槽中の緩衝液を循環させながら行った。パルスを与える前に単一電界条件(300V)にてあらかじめ試料をゲルの内部に移動させた後、電気泳動を行った。比較実験では単一電界条件のままで電気泳動を引き続き行った。

本発明ではゲル膜厚さ(面に垂直)方向に+2V直流を15秒間印加後、ゲル膜の面方向に2分間300V直流電圧を印加させ、次いでゲル膜厚さ方向の電圧を逆方向(-2V)にして同様の操作を繰り返し、さらにこの一連の操作を反復して電気泳動を行った(第3図参照)。色素がゲルの末端に達した時間で電気泳動を終了した。電気泳動ゲルを取り外し、TBE 1μℓ当たり0.5μgの臭化エチジウムを含む溶液にゲルを浸漬してDNA中に蛍光剤をスタッキングさせた後、紫外線照射をおこない蛍光をフジインスタントB&W(黑白)フィルムFP-3000Bを用いて、分

離像を撮影した。写真よりT,dC DNA (166 Kbp) のバンドとλ DNA (48 Kbp) のバンドの分離距離の差を計り、距離の差を調べた。比較実験では2.5 cm であったのに対し、本発明の電気泳動方法を用いた実験では3.5 cm で、移動距離が明らかに広くなり、本発明の効果は明らかである。

[実施例2]

15 cm × 12 cm の開口部を有する20 mm角のガラス板2枚の両端部に厚さ2 mmのスペーサーをはさみ、開口部をそれにちょうどはまり込むガラス平板で封じた後、コーンを上部に装着して第1図に示すようなゲル膜を作成した。アガロースゲル濃度は1%にし、TBEバッファ(1ℓ当たり10.3gのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、5.5gのホウ酸、0.93gのジナトリウムEDTAを含む)を用いてアガロースを溶解した。室温に放置してゲル化させた。作成したゲル膜を第2図に示す泳動装置に装着した。上部槽と下部槽にそれぞれ上記TBEバッファを入れた。

た時間で電気泳動を終了した。電気泳動ゲルを取り外し、TBE 1ℓ当たり0.5 μgの真化エチジウムを含む溶液にゲル膜を浸漬してDNA中に蛍光剤ををスタッキングさせた後、紫外線照射を行い、蛍光をフジ インスタントB&WフィルムFP-3000Bを用いて撮影し分離像を得た。写真よりT,dC DNA (166 Kbp) のバンドとλ DNA (48 Kbp) のバンドの分離距離を計り、距離の差を調べた。比較実験では2.5 cm であったが、本発明の電気泳動方法を用いた実験では3.8 cm で、移動距離が明らかに広くなっており、本発明の効果は明らかである。

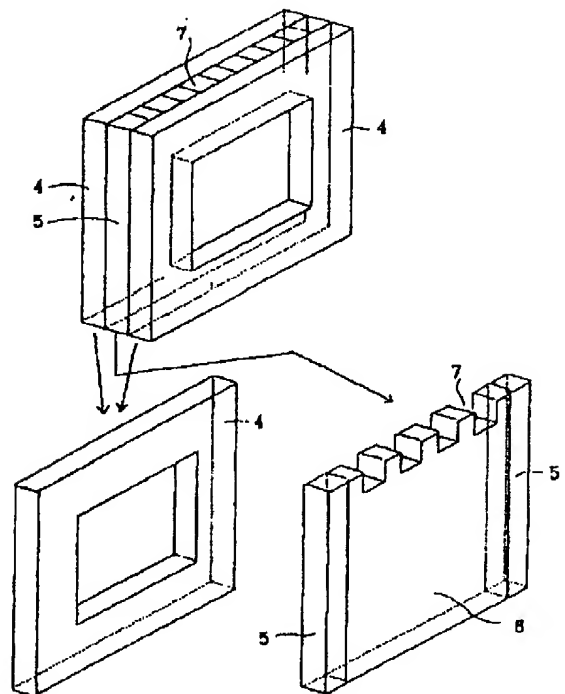
4. 図面の簡単な説明

第1図はゲル膜の形態の例を示す斜視図、第2図は泳動装置の例を示す分解斜視図である。第3図および第4図は実施例における垂直および水平方向の電圧変化の反復パターンを示す略図である。

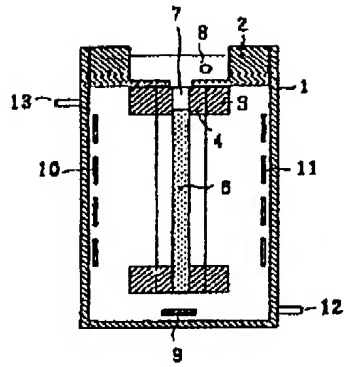
DNA試料はT,dC DNA (166 Kbp)、λ DNA (48 Kbp)、λ DNA Hind III分解物(23.13 Kbp、9.42 Kbp、6.56 Kbp、4.36 Kbp、2.32 Kbp、2.02 Kbp、0.56 Kbp、0.13 Kbp)を用いた。各DNAの試料0.02 μgを10%グリセリン、TBEバッファ、0.0015%プロモフェノールブルーから成る液5 μℓに溶かして使用した。試料は先端をカットしたピペット(Gilson Pipetman)を用いてウエルに充填した。電気泳動は温度14℃にて行った。パルスを与える前に単一電界条件(300 V)にてあらかじめ試料をゲルの内部に移動させた後、電気泳動を行った。比較実験では単一電界条件のまま電気泳動を行った。

本発明ではゲル膜厚さ(垂直)方向に第4図に示すようにパルス電圧+10 Vおよび-10 Vを0.5秒間隔で各15秒印加後、ゲル膜面(水平)方向に直流電圧300 V(電界は15 V/cm)を2分間印加し、更にゲル膜にこの操作を繰り返して電気泳動を行った。色素がゲルの末端に達し

第1図

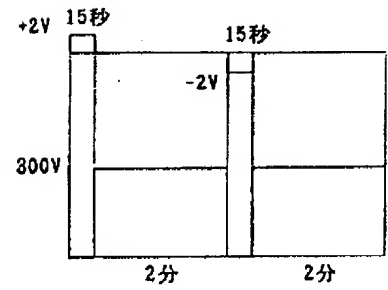


第2図



第3図

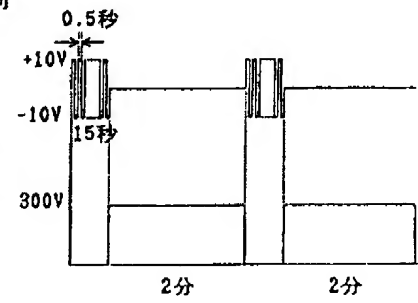
膜面に垂直の方向
の電界



膜面方向の電界

第4図

膜面に垂直の方向
の電界



膜面方向の電界